A NEHÉZVEGYIPARI KUTATÓ INTÉZET KÖZLEMÉNYEI, 15. KÖTET, 1984.
65–70. p.

A SIMPLE, SENSITIVE AND RAPID METHOD FOR THE DETERMINATION OF THE ACETYLCHOLIN ESTER CONCENTRATIONS IN INSECTS

A. SZEBENI, I. KISS, K. KOVÁCS (MRS.) BUZÁS–Á. OLÁH (MRS.) SZABÓ L. SZABÓ, A. SZÁSZ

Summary

A rapid and sensitive method has been developed for the determination of the ChE-inhibiting characteristics of newly synthetized organophosphoric acid derivatives.

The method is based on a radioenzyme reaction.

^{14}C-acetylcholin → ^{14}C-acetic acid + choline.

Acetic acid formed in the enzyme-catalyzed hydrolysis is separated by ion exchange resin and solvent extraction from the non-hydrolyzed acetylcholine. Results are compared with those obtained ba the classic Ellman-method.

EGYSZERÜ, ÉRZÉKENY ÉS GYORS MÓDSZER ROVAROK ACETILKOLINESZTERÁZÁNAK MÉRÉSÉRE

SZEBENI ATTILA – KISS ISTVÁN – KOVÁCSNÉ BUZÁS KATALIN – OLÁHNÉ SZABÓ ÁGNES – SZABÓ LÁSZLÓ – SZÁSZ ATTILA

Összefoglalás

Az intézetünkben előállított új szerves foszforsavészter molekulák acetilkolinészteráz-gátló sajátságainak vizsgálatára gyors, nagy érzékenységű módszert dolgoztunk ki. E módszer alkalmas rovarok acetilkolinészteráz aktivitásának tömeges mérésére, melyhez radioaktív ^{14}C-acetilkolint alkalmaztunk. A jelölt szubsztrátból keletkező aktív ecetsavat ioncserélő gyantán vagy szerves oldószeres extrakcióval választottuk el az enzimatikusan el nem hidrolizált acetilkolintól. Eredményeinket összehasonlítottuk a klasszikus ELLMAN módszerrel.

Bevezetés

A szerves foszforsavészterek az inszekticidek egyik igen elterjedt, széles körben alkalmazott csoportját alkotják. Hatásmechanizmusukat a hetvenes években már gyakorlatilag tisztázottnak vélték, miszerint e vegyületek kolinészteráz bénítók, és az enzimgátlás eredményeként felhalmozódó acetilkolin jellegzetes kolinerg toxikus tüneteket okoz. Később

azonban olyan új támadáspontokat fedeztek fel, mint a receptorok (1, 2), az ingerlékeny membránok (3, 4), az ATP-ase (5).

Időközben a kolineszterázra vonatkozó ismereteink is gyarapodtak. Ismeretessé vált, hogy a kolineszteráz (ChE) enzim két legfontosabb típusa, az acetilkolineszteráz (AChE) és pszeudokolineszteráz (pChE) (6), továbbá az, hogy ezek fajonként eltérő mértékben játszanak szerepet a toxikus tünetek kialakításában.

A napjainkban forgalomba kerülő, illetve a kutatás stádiumában lévő szerves foszforsavészterek egyre bonyolultabb szerkezetűek, melyek elsősorban az emlős toxicitás csökkentése érdekében egyre szelektívebbek a kártevőkre. Ugyanakkor a kártevő fajok körében kialakuló rezisztencia egyre nagyobb problémát okoz (7).

Fenti kérdések megoldásánál alapvető annak tisztázása, hogy valamely új molekula toxikus hatása milyen mértékben függ össze a ChE-gátlás erősségével. A szelektív inszekticidek kifejlesztése szempontjából lényeges, hogy az egyes fajokban található kolineszterázok szubsztrát specifitása különböző lehet (2).

A NEVIKI-ben a szerves foszforsavészterek kutatása néhány éves múltra tekint vissza. Napjainkban pedig folyamatban van egy ebbe a vegyületcsaládba tartozó originális inszekticid, a FOSZMETILÁN engedélyeztetése, és a FOSZMETILÁN hatóanyagot tartalmazó készítmények fejlesztése. Ezért alapvető fontosságúnak tartjuk, hogy a szerves foszforsavészterek kolinerg hatásmechanizmusának vizsgálatára gyors, érzékeny és megbízható biokémiai módszerek álljanak rendelkezésünkre.

Az itt közölt módszer kidolgozásánál elsősorban arra törekedtünk, hogy a rovarokban előforduló ChE mérésére alkalmas eljáráshoz jussunk, és a meghatározásokhoz egy-két rovar feldolgozása is elegendő legyen.

Az új módszert Musca domestica (standard WHO populáció) fejből nyert kolineszterázenzim-preparátumon állítottuk be. Összehasonlításként ugyanazon preparátumból az ELLMAN-féle eljárással is végeztünk méréseket (8). Ez utóbbi az orvosi és toxikológiai gyakorlatban világszerte elfogadott, mert kényelmesen és megbízhatóan alkalmazható olyan minták esetén, mint pl. a vérszérum-kolineszteráz, ahol viszonylag nagy mennyiségű és enzimtartalmú minták állnak rendelkezésre. Az ilyen rutindiagnosztikai mérésekhez az ELLMAN módszer érzékenysége is megfelelő.

Más a helyzet azonban, ha a minta rovarokból származik. Még a nagyobb méretű rovarokból is (pl. légy) a legegyszerűbb mérésekhez is többszázat kell feldolgozni, egy komplett enzimkinetikai mérés állatigénye pedig már több ezerre tehető. Kisebb állatok esetén (pl. levéltetvek, atkák) ily módon alig van lehetőség új molekulák sorozatban történő tesztelésére, pedig így jelentős kártevőfajok esnek kívül a vizsgálatok körén. További hátránya a módszernek, hogy viszonylag időigényes, így ebből a szempontból is nehezen alkalmazható sorozatmérésre nagyszámú minta esetén.

Anyag és módszer

A légyfej-homogenizálást 50 mM-os, pH 7.2, foszfát pufferben (10-szeres térfogatban), 4 °C-on végeztük

A homogenátumot 12 000 g-vel 15 percig centrifugáltuk, szintén 4 °C-on. A felülúszót, mint enzimet használtuk.

A referenciaként használt ELLMAN-módszer inkubációs elegy a következő volt:

2,9 ml Na-foszfát pufferben oldott DTNB reagens (0,15 mg/ml 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoe sav)

0,1 ml szubsztrát (acetiltiokolin-jodid 156 mM)

0,1 ml víz, vagy ebben oldott enzim gátlószer;

fotométeren 412 nm-nél öt percig mértük a szubsztrát spontán hidrolízisát 30 °C-os inkubációs hőmérsékleten, majd 20 μl enzimet adtunk a fenti elegyhez. További 10 perc inkubálás után az enzimatikus hidrolízis és a spontán szubsztrát-hidrolízisextinkció különbségéből számoltuk az enzim aktivitását.

Ugyanezen homogenizátumból vett aliquotokat használtuk az izotópos technikával történő AChE meghatározás kidolgozásánál is.

A kidolgozott új metodika lényege, hogy az izotóppal jelzett ACh hidrolízise során keletkezett ^{14}C-ecetsavat mértük. Alapvető problémát az jelentett, hogy az inkubálás befejezésekor még nagy mennyiségben van jelen hidrolizálatlan aktív ACh. Ettől el kellett választanunk a jelölt ecetsavat. Az elválasztás során figyelemmel voltunk arra, hogy a folyadékszcintillációs méréseket zavaró anyagok ne kerüljenek az ecetsav mellé. Az elválasztásra két alkalmas módszert dolgoztunk ki.

A) Ioncserés módszer

Az inkubációs elegy összetétele a következő volt:

500 μl 50 mM K-foszfát puffert (pH 7,2), 0,5% Triton-X-100-at, és 2 mM ACh-t tartalmazó oldat.
50 μl ^{14}C-acetilkolin (kb. 100 000 CPM)
10 μl enzim

A felhasznált ^{14}C-acetilkolin (AMERSHAM) specifikus aktivitása 1,59 MBq/mmol volt. Az elegyet 30 °C-on 10 percig inkubáltuk. Az enzimaktivitás 10 percen belül még lineáris. Az inkubálás végén a keletkezett ecetsavat FLUKA Dowex 50W × 8 200–400 mesh H^+-forma kationcserélő gyantán (3 × 0,5 cm) nyertük ki az oszlopra vitt 50 μl inkubációs elegyből. Az ecetsavat az oszlopról 2 ml hideg vízzel folyadékszcintillációs küvettába mostuk, és BRAY koktélban (9) mértük.

B) Extrakciós módszer

A fent leírt eljárást tovább egyszerűsítettük. A rovarfej-homogenizálást hasonlóan 50 mM-os K-foszfát pufferben végeztük. Az alábbi inkubációs elegyet használtuk:

40 μl K-foszfát puffer
10 μl ^{14}C-acetilkolin (kb. 50 000 CPM)
10 μl acetilkolin (16 mM ACh pufferban)
20 μl enzim

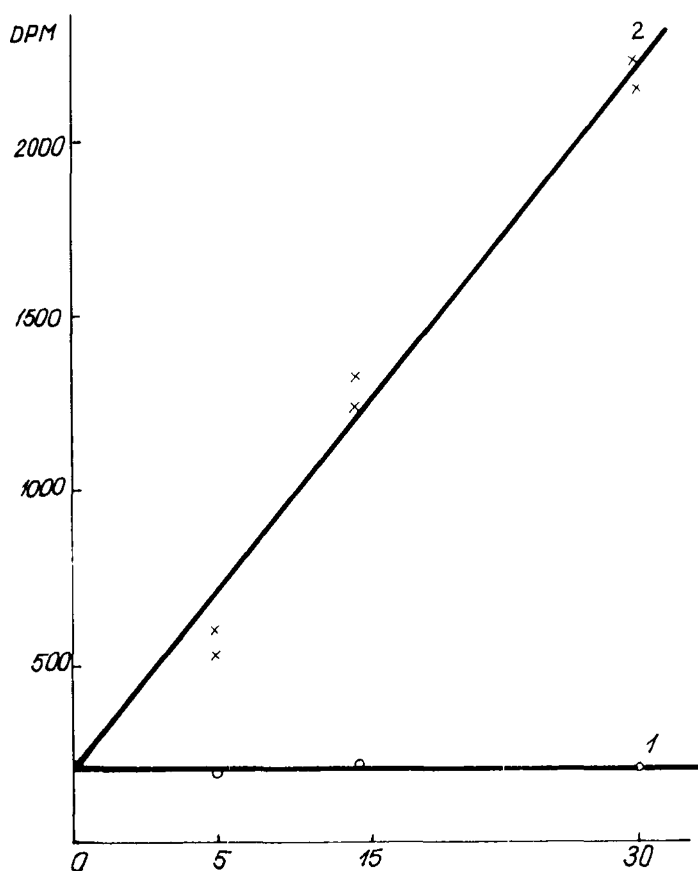
Az inkubációs végtérfogat 80 μl, amelybe a 40 μl pufferben oldva vihető be a vizsgálati anyag. Az inkubálást 10 percig, 30 °C-os vízfürdőben végeztük.

A reakció végén az inkubációs elegy 50 μl-es aliquotját 100 μl stop-oldattal állítottuk le. Ennek összetétele 1M triklórecetsav, 0,5 M NaOH, 2M NaCl volt. A leállított reakciót kirázócsőben 4 ml 9 : 1 arányú toluol-amilalkohol-keverékkel extraháltuk, majd a denaturálódott fehérjét 2000 g-vel lecentrifugáltuk és a felülúszó szerves fázisból 2 ml-t leszívtunk, amely a jelzett ecetsavat tartalmazta. A leszívott szerves fázist toluolos alapú szcintillációs koktélban mértük, megfelelő korekciós quench-görbe felhasználásával. A mérés hatásfoka nagyobb volt, mint 70%. Az el nem reagált ACh a denaturálódott fehérjével a vizes fázisban maradt.

Eredmények és következtetések

a) A két új izotópos technika összehasonlítása

A kidolgozott két új módszer közül az utóbbi extrakciós technika bizonyult kényelmesebbnek, gyorsabbnak. Az ioncserélő oszlopok készítésének hosszadalmas procedurája, valamint a nagyobb anyagmennyiség miatt elsősorban a szerves oldószeres extrakciót részesíthetjük előnyben. Hátránya viszont, hogy olyan esetekben amikor nem „friss'' izotóppal dolgozunk és az izotóp előállítása és felhasználása között eltelt hosszú idő alatt keletkező radiolitikus szennyeződés van jelen, zavarja a meghatározást. Ilyen esetekben az ioncserélő technika alkalmazása célszerűbb.



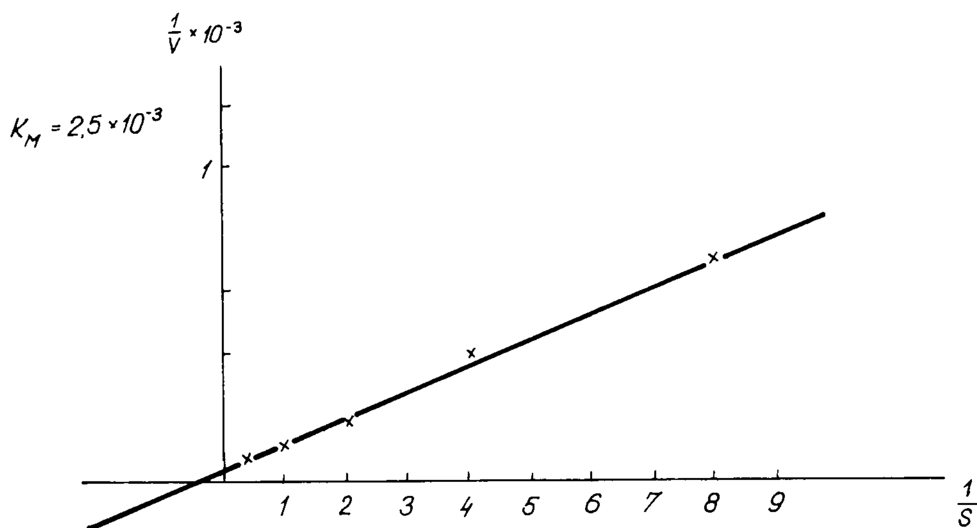
1. ábra
Az ACh hidrolízis időfüggés
Az ordinátán a keletkezett ^{14}C-ecetsav aktivitása.
1-es görbe: ezimnélküli kontroll
2-es görbe: enzimet tartalmazó inkubációs elegy
Az ACh hidrolízise az idővel lineárisan változik 0–30 min. mérési tartományban.

b) Időfüggés

Az 1-es ábra mutatja, hogy az ACh hidrolízise az idővel lineárisan változik 0–30-ig. Az a tény, hogy az enzimatikus hidrolízis sebessége ilyen sokáig állandó marad, arra enged következtetni, hogy a légyfejből nyert ChE a jelen mérési körülmények között stabil, valamint az enzim-szubsztrát arány helyesen van megválasztva.

c) Szubsztrátkoncentráció -függés

Kimutattuk, hogy a hidrolízis sebessége az enzimatikus reakcióra leírt LINEVEAWER-BURK függvény (10) szerint változik a szubsztrátkoncentrációval. 2. ábra.



2. ábra
ACh-aktivitás szubsztrátkoncentráció-függése.
Lineveawer-Burk ábrázolás.
Abszcisszán a szubsztrátmennyiség reciproka
Ordinátán a reakciósebesség reciproka

d) Az ELLMAN-módszerrel való összehasonlítás

Tekintve, hogy ugyanabból a mintából kétféle módszerrel végeztünk meghatározásokat, alkalmunk volt az összehasonlításra. Ez annál is inkább fontos, mert az új módszert csak egy ismert standard technikához hasonlítva fogadhatjuk el korrektnek.

Az összehasonlításnál felmerült egy lényeges elméleti probléma. Az ELLMAN-módszer acetil-tiokolint, míg az izotópos eljárásunk acetilkolint használ szubsztrátként. Látszólag így nem végezhetjük el az összehasonlítást. Van azonban egy mód, ami mégis lehetővé teszi a két eljárás közös nevezőre hozását. Arról van szó, hogy a légyfej-AChE felhasználja szubsztrátként az acetil-tiokolint is (6). Így nem a különböző szubsztrátokra jellemző K_m értékeket, hanem az U sebességértékeket hasonlíthatjuk össze, mint azt más szerzők is teszik (11).

U = unit (egység), amely 1 μmol/min sebességgel hidrolizálja az ACh-t.

Légyfej ChE-ra nézve

ELLMAN-módszerrel: U = 0,527 ±0,039 μmol/min
Izotópos módszerrel: U = 0,538 ±0,038 μmol/min

Az adott kísérleti körülmények között tehát az új eljárásunkkal kapott eredmények teljes egyezést mutatnak a Konvencionális ELLMAN-módszerrel.
A jövőben a fentiek alapján a ^{14}C-jelölt ACh-ra alapozott mérési technikát használjuk fel az új molekulák kolineszterázra gyakorolt hatásának értékelésére.

Irodalom

(1) P. Wolf, L. Máté, I. Herczeg: Kísérleti és Klinikai Toxikológiai Szinpózium, 1983. közlés alatt.
(2) G. T. Broks: In Insect Neurobiology and Pesticide Action. London. Society of Chemical Industry, 1980. 46-49.
(3) Fossier Baux - Taue: Nature 301, 710. (1983)
(4) R. W. Beeman: Ann. Rev. Entomol. 27, 253. (1982)
(5) N. R. Price,: Comp. Biochem. Physiol. 55C, 91. (1976)
(6) A. De Bruin.: Biochemical Toxicology of Enviromental Agents. Elsevier, 1976. 982–983.
(7) Sawicki - Devonshire - Rice: Pest. Sci. 9, 189. (1978).
(8) G. L. Ellman, K. D. Andres, R. M. Featherstone,: Biochem. Pharmacol. 7, 88. (1961)
(9) G. A. Bray,: Anal. Biochem 1, 279. (1960)
(10) C. Walsh,: Enzymatic Reaction Mechanisms. Freeman and Co., San Francisco, (1977) 67.
(11) Johnson–Russel: Anal. biochem. 64, 229. (1975)